

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-238440

(P2003-238440A)

(43) 公開日 平成15年8月27日 (2003.8.27)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

キーワード* (参考)

A 6 1 K 38/00

A 6 1 P 1/16

4 C 0 8 4

A 6 1 P 1/16

11/00

11/00

17/00

17/00

25/00

25/00

A 6 1 K 37/02

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号

特願2002-39844(P2002-39844)

(22) 出願日

平成14年2月18日 (2002.2.18)

(71) 出願人 899000079

学校法人慶應義塾

東京都港区三田2丁目15番45号

(72) 発明者 東 俊文

東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学

医学部内

(72) 発明者 北村 直人

東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学

医学部内

(74) 代理人 100098121

弁理士 間山 世津子 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維化抑制剤

(57) 【要約】

【課題】 線維化を予防および/または治療するのに有効な薬剤を提供すること。

【解決手段】 フォリスタチンを有効成分として含む線維化抑制剤。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 フォリスタチンを有効成分として含む線維化抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、線維化抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】臓器組織の局所に線維成分が増加することは線維化と呼ばれる。このような線維化は、肺、肝臓、皮膚などで見られる。臓器における過剰な線維化は硬化性疾患を引き起こすが、臓器における線維化を予防および／または治療するのに有効な薬剤は数少ない。

【0003】フォリスタチンは、部分肝切除後の肝再生の促進に有効であることが知られている（GASTROENTEROLOGY 1995;108:1136-1142）が、線維化の予防および／または治療に有効であることは知られていなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、線維化を予防および／または治療するのに有効な薬剤を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、フォリスタチンの投与による肝線維化に対する影響を調べたところ、フォリスタチンの投与により肝線維化が有意に抑制されることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、フォリスタチンを有効成分として含む線維化抑制剤を提供する。フォリスタチンは、胎児の胎盤、卵巣、肝臓などでつくられる生体由来の物質であるため、ヒトに投与した場合にも、安全でアレルギー反応も少ないと考えられる。

【0006】本明細書において、「フォリスタチン」とは、FSH分泌抑制作用をもつ不活性複合体を形成する分子量40000～45000の一本鎖の糖蛋白で、アクチビン1分子にフォリスタチン2分子が結合し、不活性複合体を形成する。複合体形成により、アクチビンは受容体への結合能を消失する（Science 247 (1990) 836-838; Mol. Cell. Endocrinol. 1996 15; 116 (1): 105-14）。そのアミノ酸配列は、例えば、NP_037541、NP_006341に記載されている。

【0007】「線維化抑制剤」とは、皮膚、臓器などの生体組織における線維化の進展を予防および／または治療するのに有効な薬剤をいう。臓器とは、呼吸、排泄、消化などの特別な機能を営む身体の部分であり、肺、肝臓、骨髄、腎臓、心臓、脾臓、皮膚などが含まれる。本発明の線維化抑制剤は、臓器、特に肝臓における線維化の予防および／または治療に効果的である。

【0008】本発明の線維化抑制剤は、肝硬変、肺線維症、硬化性腹膜炎、腎硬化症、心筋症の一部（異常心筋症など）、心筋虚血（心筋梗塞）、慢性関節リウマチ、

強皮症をはじめとする線維化によって引き起こされる種々の疾患の予防・治療に応用できる。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】本発明において有効成分として用いられるフォリスタチンは公知の方法、例えば、Biochem Biophys Res Commun. 1992 30; 185(3): 1148-54に記載の方法により調製することができる。

【0011】フォリスタチンは単独で、あるいは、薬理的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とともに、適当な剤型の医薬組成物として、哺乳動物（例えば、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の線維化（例えば、肝線維化）の予防・治療のために使用する場合には、フォリスタチンを1回量として通常5～20μg/kg体重程度、好ましくは10～15μg/kg体重程度を、1週間に3回程度の頻度で、好ましくは2日に1回程度の頻度で、静脈注射により投与（好ましくは、連続または隔日投与）するとよい。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合にはその症状に応じて増量してもよい。

【0012】経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は常法により製造することができ、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有してもよい。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどがあげられる。

【0013】非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などがあげられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤型であるといふ。かかる注射剤は常法、すなわちフォリスタチンを通常注射剤に用いられる無菌の水溶性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製される。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤（例えば、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は通常適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、フォリスタチンを通常の坐薬用基剤に

混合することによって調製することができる。

【0014】上記の経口用または非経口用医薬組成物は、有効成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されるとよい。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが挙げられ、それぞれの投薬単位剤形当り通常0.125～1.000 mg、特に注射剤では0.125～1.000 mg、その他の剤形では0.125～1.000 mgのフォリスタチンが含有されていることが好ましい。

【0015】また、上記の医薬組成物は、フォリスタチンとの配合により好ましくない相互作用を生じない限り、他の有効成分を含有してもよい。

【0016】

【実施例】以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0017】[実施例1] フォリスタチン投与による肝線維化の抑制方法

Wistar系雄ラット（体重380g）に、dimethylnitrosamine（東京化成工業（株）、D0761（ $(\text{CH}_3)_2\text{NNO}$ =74.08）、DMN、生理食塩水で1000倍希釈し、10 $\mu\text{g/g}$ 体重を週のうち連続3日投与）を腹腔内投与した。同時に生理食塩水またはフォリスタチン（味の素中央研究所の江藤氏の厚意により提供、1 μg 又は2 $\mu\text{g/g}$ （個体）をhalothane麻酔下に尾静脈より隔日投与した。対照群には、DMN投与群と同量の生理食塩水を腹腔内投与し、さらに尾静脈に静注した。3週間の投与の後、各ラットの下大静脈より採血し、4%paraformaldehydeを門脈灌流して、肝臓を固定した。H-E染色・Masson-trichrome染色・鍍銀染色を施行し（図1および2）、 α -smooth muscle actin、TGF- β の局在を免疫組織化学的に検討した（図3）。血中GOT・GPT・ALP・ヒアルロン酸活性値は常法（GPT/GOT: Clin. Chim. Acta. 70, F19 (1976), : ibid., 80, F21 (1977); Clin. Chim., 24, 58 (1978), ALP: Klin. Chem. Klin. Biochem., 8 658 (1970), : ibid., 10 182 (1972), ヒアルロン酸: Hepatology, 6: 392-395, 1986)を用い、albuminはELISA法（Clin. Chim. Acta 31: 87-96, 1971）により測定した（図4～7）。また、肝臓中のhydroxyproline濃度をHPLC法により測定した（Medical Technology 6 (13): 1128-1132, 1978; Anal. Biochem. 166: 72-78, 1987）（図8）。さらに、TUNEL法（Circulation 1999; 100: 1909-1916）にて、アポトーシス（細胞レベルでの死）を定量した（図9）。最後に3週間での生存率を評価した。DMNを腹腔内投与しながら生理食塩水を静注したラット計20匹（DMN+saline）、DMNを腹腔内投与しながらフォリスタチン1 μg （5匹）もしくは2 μg （6匹）を静注したラット計11匹（DMN+フォリスタチン）で生存率を比較した（図10）。

【0018】成績

3週間後の生存率は生理食塩水投与群で50%（20匹中10匹）、フォリスタチン投与群で90.1%（11匹中10匹）であった（図10）。血清中のGOT・GPT・ALP・albumin・ヒアルロン酸値は、対照群→フォリスタチン 2 μg 投与群の比較において、 $224.2 \pm 47.5 \text{ IU/l} \rightarrow 153.6 \pm 14.6 \text{ IU/l}^*$ 、 $152.4 \pm 38.7 \text{ IU/l} \rightarrow 70.0 \pm 14.5 \text{ IU/l}^*$ 、 $1147.6 \pm 44.8 \text{ IU/l} \rightarrow 654.0 \pm 224.8 \text{ IU/l}^*$ 、 $2.8 \pm 0.3 \text{ g/dl} \rightarrow 3.8 \pm 0.5 \text{ g/dl}^*$ 、 $586.2 \pm 223.2 \text{ ng/ml} \rightarrow 104.6 \pm 130.0 \text{ ng/ml}^*$ （*： $p < 0.05$ v.s. 生理食塩水投与群）であり、いずれもフォリスタチン投与群で有意に改善を認めた（図4～7）。これらのことから、フォリスタチンの投与により、DMNによる肝機能障害を用量依存的に抑制できることがわかった。H-E染色・Masson-trichrome染色・鍍銀染色では、生理食塩水投与群は肝小葉の構築が著しく破壊され、線維化、限界板の破壊、piecemeal necrosisが認められたが、フォリスタチン2 μg 投与群では著明に改善を認めた（図1および2）。免疫組織化学的検討（図3）では、線維化した範囲にはコラーゲンが染色されるが、図3の下図のように生理食塩水投与群（左図）ではコラーゲンで染色される部位が広く認められたが、フォリスタチン2 μg 投与群（右図）では染色される範囲はごくわずかで、線維化が抑制されていることがよく分かった。また、線維化すると α -actin陽性細胞が検出されるようになるが、図3の上図のように生理食塩水投与群（左図）では α -actin陽性細胞が多数検出されたが、フォリスタチン2 μg 投与群（右図）ではほとんど検出されなかった。また、DMNの投与によりhydroxyproline濃度が上昇しており、肝組織の線維化を伴っていることが分かった（図8）。これもまた、フォリスタチンを同時に投与する事で用量依存的に増加を抑制できており、フォリスタチン2 μg 投与群では有意差も認めた。これらのことから、フォリスタチン投与により、DMNによる線維化を用量依存的に抑制できることがわかった。DMN投与にて18%にアポトーシスを認めたが、フォリスタチンを同時に投与する事でアポトーシスは抑制され、2 μg 投与群では8%と有意差も認めた（図9）。

【0019】結論

DMNによる肝機能障害・肝線維化は、フォリスタチン投与により有意に抑制され、その程度は用量依存性であり、さらには肝機能障害・肝線維化の抑制により、死亡率の低下につながるものと推測される。

【0020】

【発明の効果】本発明の薬剤は、線維化抑制剤として効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】DMNを3週間、腹腔内投与しながら、生理食塩水を静注したラット（DMN）とフォリスタチン 2 μg を静注したラット（DMN+Follistatin）の肝臓切片をH-E染色（HE）・Masson-trichrome染色（MT）にて比較したものであ

る。上の図がH-E染色、下の図がMasson-trichrome染色による比較をしたものである。

【図2】上の図は生理食塩水を静注したラット (DMN) とフォリスタチン 2 μ gを静注したラット (DMN+Follistatin) の肝臓切片をH-E染色 (HE) にて比較したものである。下の図は生理食塩水を静注したラット (DMN) とフォリスタチン 2 μ gを静注したラット (DMN+Follistatin) の肝臓切片を鍍銀染色 (Silver) したものである。

【図3】生理食塩水を静注したラット (DMN) とフォリスタチン 2 μ gを静注したラット (DMN+Follistatin) の両群を免疫組織学的に検討した結果である。下の図はコラーゲンで染色される部位を示し、上の図は α -smooth muscle actin (SMA) で染色される部位を示す。

【図4】肝機能障害の程度を血清学的に評価するため、血清中のGOTおよびGPTを測定した結果である。左からそれぞれ、生理食塩水を腹腔内投与および静注したラット (control)、DMNを腹腔内投与しながら生理食塩水を静注したラット (saline)、DMNを腹腔内投与しながらフォリスタチン1 μ gを静注したラット (F=1 μ g)、DMNを腹腔内投与しながらフォリスタチン2 μ gを静注したラット (F=2 μ g) である。DMNの投与によりGOT・GPTともに上昇し、高度な肝機能障害を認めた。フォリスタチン投与群でも上昇は認めたが、その程度は生理食塩水投与群に比べると有意差をもって抑制されていた。

【図5】血清中のALPを調べた結果である。DMNの投与により高度な肝機能障害を伴ったことがよく分かる。しかし、フォリスタチンを同時に投与する事で、その障害の

抑制を認め、フォリスタチン2 μ g投与群では有意差も認めた。

【図6】肝予備能評価のため、血清中のalbuminを測定した結果である。DMNの投与により肝予備能の低下を認めたが、フォリスタチンを同時に投与する事で、その低下は抑制され、フォリスタチン2 μ g投与群では有意差も認めた。

【図7】線維化を定量するため、肺や肝臓の線維化マーカーであるヒアルロン酸 (hyaluronic acid) を評価した結果である。DMNの投与によりヒアルロン酸の著しい増加が認められ、高度な線維化を伴っていることが分かる。フォリスタチンを同時に投与する事で、ヒアルロン酸の増加は抑制され、1 μ g・2 μ gともに有意差も認めた。

【図8】肝臓中のhydroxyproline濃度を測定した結果である。DMNの投与によりhydroxyproline濃度が上昇しており、肝組織の線維化を伴っていることが分かる。これもまた、フォリスタチンを同時に投与する事で用量依存的に増加を抑制できており、フォリスタチン2 μ g投与群では有意差も認めた。

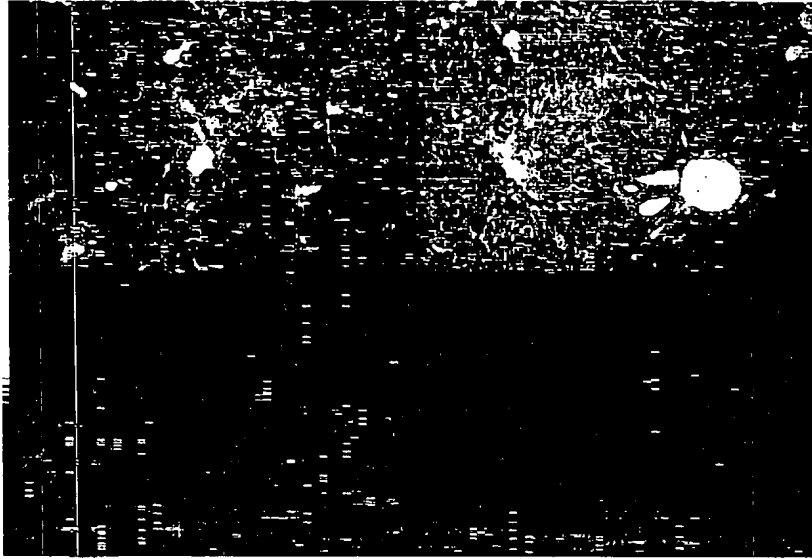
【図9】TUNEL法にて、アポトーシス (細胞レベルでの死) を定量した結果である。DMN投与にて18%にアポトーシスを認めたが、フォリスタチンを同時に投与する事でアポトーシスは抑制され、2 μ g投与群では8%と有意差も認めた。

【図10】3週間での生存率を評価した結果である。

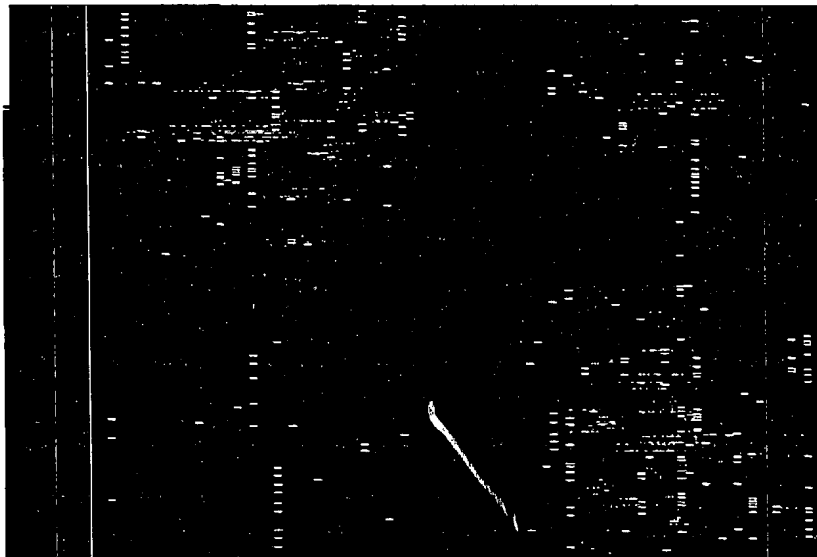
【図1】



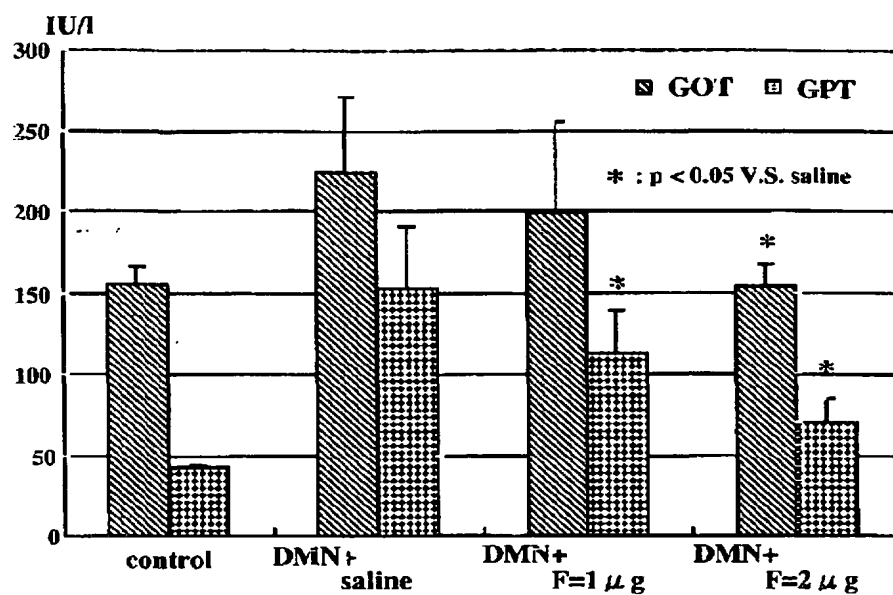
【図2】



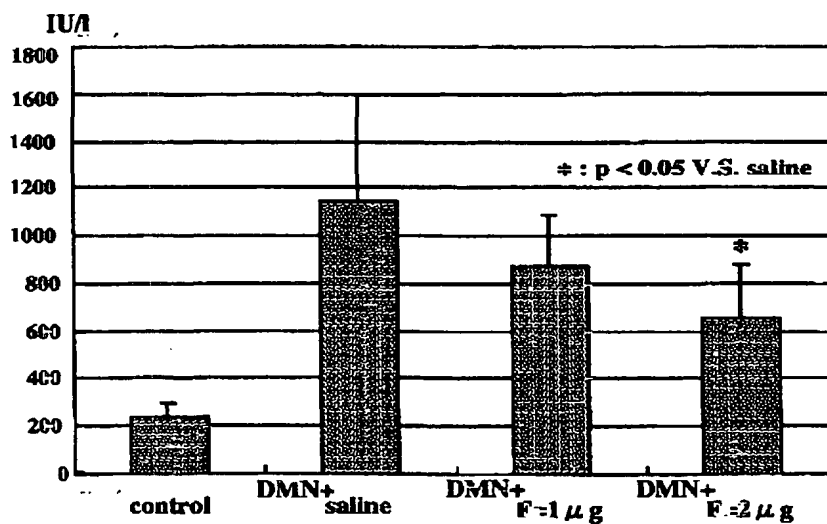
【図3】



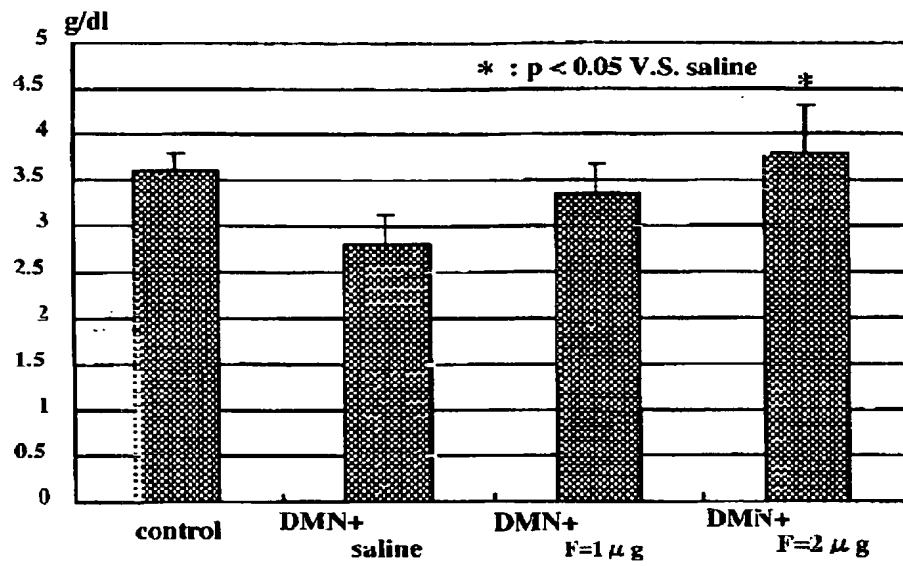
【図4】



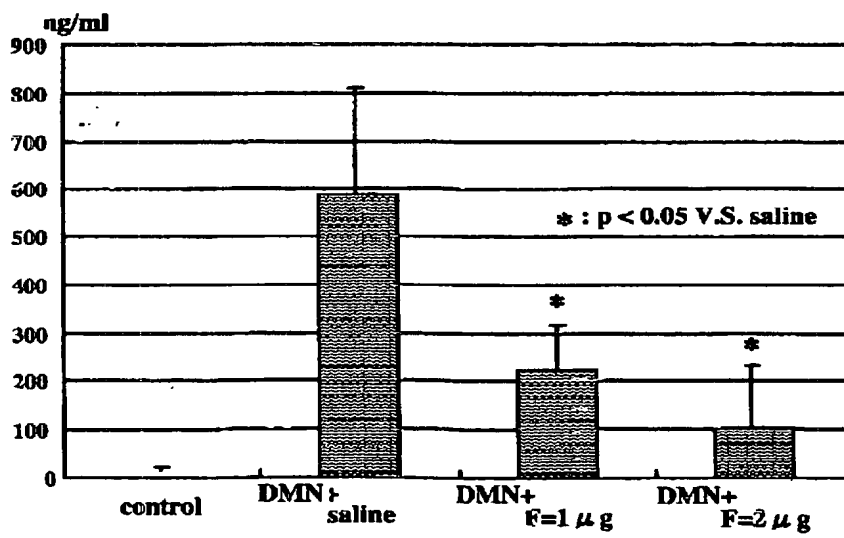
【図5】



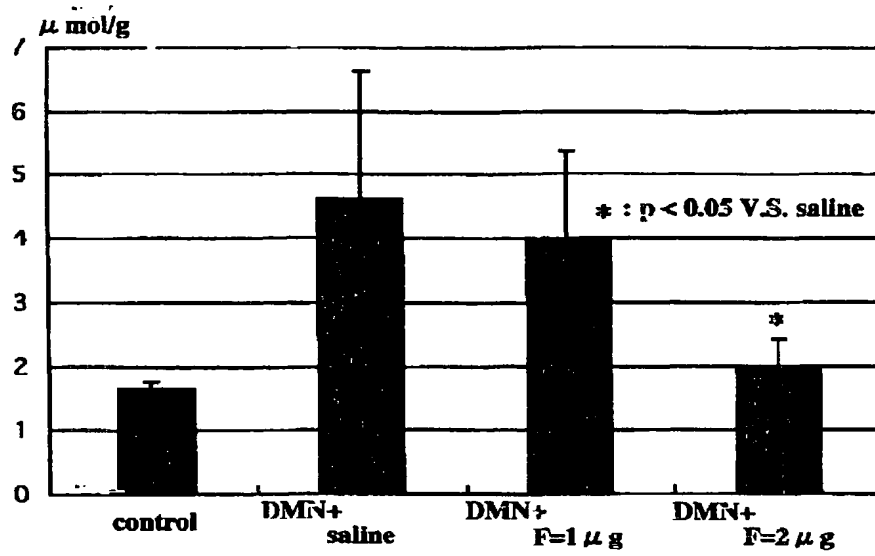
【図6】



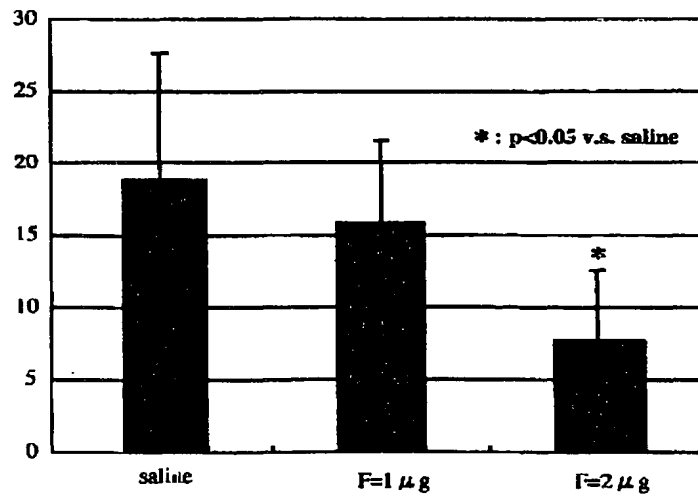
【図7】



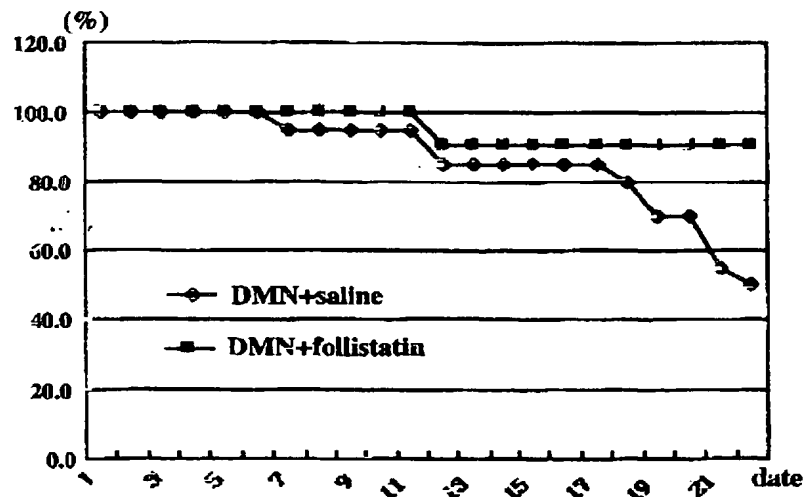
【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(72)発明者 石井 裕正
東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学
医学部内

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA44 NA14 ZA022
ZA752 ZA892

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2003238440
PUBLICATION DATE : 27-08-03

APPLICATION DATE : 18-02-02
APPLICATION NUMBER : 2002039844

APPLICANT : KEIO GIJUKU;

INVENTOR : ISHII HIROMASA;

INT.CL. : A61K 38/00 A61P 1/16 A61P 11/00
A61P 17/00 A61P 25/00

TITLE : FIBROSIS INHIBITOR



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a fibrosis inhibitor useful as a medicament for preventing and treating the fibrosis.

SOLUTION: This fibrosis inhibitor contains follistatin as an active ingredient.

COPYRIGHT: (C)2003,JPO

Disclaimer:

This English translation is produced by machine translation and may contain errors. The JPO, the INPIT, and those who drafted this document in the original language are not responsible for the result of the translation.

Notes:

1. Untranslatable words are replaced with asterisks (***).
2. Texts in the figures are not translated and shown as it is.

Translated: 22:05:17 JST 04/19/2011

Dictionary: Last updated 04/08/2011 / Priority:

CLAIM + DETAILED DESCRIPTION

[Claim(s)]

[Claim 1] A fibrosis depressant which contains follistatin as an active principle.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to a fibrosis depressant.

[0002]

[Description of the Prior Art] It is called fibrosis that a fiber ingredient increases to the part of an organ organization. Such fibrosis is seen on a lung, liver, the skin, etc. A few [although the superfluous fibrosis in an organ causes a hardenability disease / drugs effective in preventing and/or treating the fibrosis in an organ].

[0003] it is known that follistatin is effective in promotion of the liver regeneration after partial hepatectomy -- **** (GASTROENTEROLOGY 1995;108:1136-1142) -- it was not known that it is effective in prevention and/or the therapy of fibrosis.

[0004]

[Problem to be solved by the invention] An object of this invention is to provide drugs effective in preventing and/or treating fibrosis.

[0005]

[Means for solving problem] When this invention persons investigated influence on the liver fibrosis by administration of follistatin, they find out that liver fibrosis is intentionally controlled by administration of follistatin, and came to complete this invention. That is, this invention provides the fibrosis depressant which contains follistatin as an active principle. It is thought that it is safe and there are also few allergic reactions also when Homo sapiens is medicated, since follistatin is a substance of the living body origin built with an embryonic placenta, the ovary, liver, etc.

[0006] In this Description, "follistatin" is glycoprotein of the single strand of the molecular weights 40000-45000 which form an inactive complex with an FSH acrinia operation, follistatin dyad combines with one molecule of activin, and an inactive complex is formed. By complex formation, activin disappears the binding affinity to a receptor (Science 247 (1990) 836-838; Mol. Cell. Endocrinol. 1996 15; 116 (1):105-14). The amino acid sequence is indicated to NP_037541 and NP_006341, for example.

[0007] The "fibrosis depressant" refers to drugs effective in preventing and/or treating progress of the fibrosis in body tissues, such as the skin and an organ. An organ means the portion of the body which performs special functions, such as breathing, elimination, and digestion, and a lung, liver, bone marrow, the kidney, the heart, the pancreas, the skin, etc. are contained. The fibrosis depressant of this invention is effective for the prevention and/or the therapy of fibrosis in an organ, especially liver.

[0008] The fibrosis depressant of this invention is applicable to prevention and the therapy of various diseases caused by fibroses including a part of liver cirrhosis, the fibroid lung, peritonitis sclerosing, nephrosclerosis, myocardosis (unusual myocardosis etc.), myocardial ischemia

(myocardial infarction), rheumatoid arthritis, and a scleroderma.

[0009]

[Mode for carrying out the invention] Hereafter, this invention is explained in detail.

[0010] Method, for example, Biochem Biophys Res Commun. 1992, that the follistatin used as an active principle in this invention is publicly known 30; 185 (3) : It can prepare by the method of a description to 1148-54.

[0011] An oral target or a parenteral target can be medicated with follistatin as a medicinal composition of a suitable pharmaceutical form with the carrier, diluent, or excipient which is independent or may be permitted pharmacologically to mammalian (for example, Homo sapiens, a rabbit, a dog, a cat, Latt, a mouse). Although a dose changes with the object disease for administration, condition, routes of administration, etc., For example, in using it for prevention and the therapy of of an adult fibrosis (for example, liver fibrosis). making follistatin into a single dose -- usually -- a 5-20microg/kg weight grade -- it is good to be about 3 times of frequency, to be about 1 time of frequency and to prescribe a 10-15microg/kg weight grade for the patient by an intravenous injection preferably, on the 2nd at one week (a medicine is preferably prescribed for the patient continuation or every other day). Also in other parenteral administration and internal use, the quantity according to this can be prescribed for the patient. When condition is especially heavy, it may increase according to the condition.

[0012] As a constituent for internal use, a tablet (a sugar-coated tablet and a film coated tablet are included), a pill, a granule, powder medicine, a capsule (a soft capsule agent is included), syrups, an emulsion, suspension, etc. are given to the dosage forms of a solid or a fluid, and a concrete target. This constituent can be manufactured with a conventional method and may contain the carrier, diluent, or excipient usually used in the pharmaceutical preparation field. For example, as the carrier for tablets, and an excipient, milk sugar, starch, ****, magnesium stearate, etc. are raised.

[0013] As a constituent for parenteral administration, for example, injections, suppositories, etc. are raised and injections are good in their being pharmaceutical forms, such as an intravenous injection agent, a subcutaneous injection agent, an intradermal injection agent, an intramuscular injection agent, and an intravenous drip infusion agent. These injections are prepared by dissolving, suspending or emulsifying a conventional method, i.e., follistatin, to the sterile aqueous or oily liquid usually used for injections. The isotonic solution etc. which contain the adjuvant of a physiological saline, grape sugar, or others as aqueous liquid for injection are raised. A suitable solubilizing agent (for example, ethanol), for example, alcohol, polyalcohol. (For example, propylene glycol and a polyethylene glycol), a nonionic surface active agent. (For example, polysorbate 80, HCO-50 (polyoxyethylene(50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)) etc. -- it may use together. Sesame oil, soybean oil, etc. are raised as oily liquid, and benzyl benzoate, benzyl alcohol, etc. may be used together as a solubilizing agent. A usually suitable ampul is filled up with the prepared parenteral solution. The suppositories used for rectum administration can be prepared by mixing follistatin to the usual base for suppositories.

[0014] An above-mentioned object for taking orally or a medicinal composition for parenteral is good to be prepared by dosage forms of a medication unit which suits a dose of an active principle. As dosage forms of this medication unit, a tablet, a pill, a capsule, injections (ampul), Suppositories etc. are mentioned and it is preferred per each medication unit dosage forms usual [0.125] - 1.000 mg, and that follistatin of 0.125 - 1.000 mg especially contains with dosage forms of 0.125 - 1.000 mg and others at injections.

~~[0015] The above-mentioned medicinal composition may contain other active principles, unless an interaction which is not preferred is produced by combination to follistatin.~~

[0016]

[Working example] Hereafter, working example explains this invention concretely. These working example is for explaining this invention, and does not limit the range of this invention.

[0017] [inhibition method Wistar system male Latt (weight of 380g) of liver fibrosis by [working example 1] follistatin administration] dimethylnitrosamine (it dilutes with Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., DO761 (CH₃) (NNO=74.08), DMN, and a physiological saline 1000 times, and is continuation three-day administration among weeks about 10 microg [/g] weight) was injected

intraperitoneally. A physiological saline or follistatin (they are offer, 1microg or 2microg / individual by kindness of Mr. ETO, Yuzuru of Ajinomoto Central Research Laboratory) was simultaneously prescribed for the patient every other day from a caudal vein under halothane anesthesia. In a control group, tales doses of physiological salines to a DMN administration group were injected intraperitoneally, and it injected intravenously to a caudal vein further. It collected blood from an inferior vena cava of each rat after administration for three weeks, the portal vein inflow of the paraformaldehyde was carried out 4%, and liver was fixed. H-E dyeing, Masson-trichrome dyeing, and silvering dyeing were enforced (drawing 1 and 2), and localization of alpha-smooth muscle actin and TGF-beta was examined immunohistochemically (drawing 3). GOT-GPT-ALP in blood, and a hyaluronic acid activity value A conventional method. (GPT/GOT: Clin. Chim. Acta.70, F19 (1976); ibid., 80, F21 (1977); Clin. Chim., 24, 58 (1978), ALP:Klin. Chem. Klin. Biochem. and 8 658 (1970) : ibid. and 10 182 (1972), Hyaluronic acid: Hepatology, 6: albumin was measured using 392-395 and 1986 by the ELISA method (Clin. Chim. Acta 31: 87-96, 1971) (drawing 4 -7). hydroxyproline concentration in liver was measured by the HPLC method (drawing 8 (Medical Technology 6 (13): 1128-1132, 1978; Anal. Biochem. 166:72-78, 1987)). It is the bottom (drawing 9) about a fixed quantity of apoptosis (death in a cell level) with a TUNEL assay (Circulation 1999; 100: 1909-1916). Finally a survival rate for three weeks was evaluated. Latt who injected a physiological saline intravenously while injecting DMN intraperitoneally -- Latt who injected intravenously follistatin 1microg (five animals) or 2microg (six animals) while injecting intraperitoneally a total of 20 animals (DMN+saline) and DMN -- a total of 11 animals (DMN+ follistatin) compared a survival rate (drawing 10).

[0018]The survival rate after three weeks of results was 90.1% (inside of 11 animals ten animals) by the follistatin administration group 50% (inside of 20 animals ten animals) in the physiological saline administration group (drawing 10).[GOT-GPT-ALP-albumin and the hyaluronic acid value in a blood serum] Control group -> follistatin. In comparison of a 2microg administration group, 224.2**47.5IU/l->153.6**14.6IU/l*, 152.4**38.7IU/l->70.0**14.5IU/l*, 1147.6**448.4IU/l->654.0**224.8IU/l*, It is 2.8 **0.3-g/dl->3.8**0.5 g/dl* and 586.2**223.2 ng/ml->104.6**130.0ng/ml* (*:p<0.05v.s. physiological saline administration group).

All accepted the improvement intentionally by the follistatin administration group (drawing 4 -7). From these things, administration of follistatin showed that the impaired liver function by DMN could be controlled on a dosage dependence target. Although construction of the liver lobule was destroyed remarkably and destruction of fibrosis and a marginal board and piecemeal necrosis were accepted, [H-E dyeing, Masson-trichrome dyeing, and silvering dyeing] [a physiological saline administration group] The improvement was permitted to Tsuguaki by the follistatin 2microg administration group (drawing 1 and 2). Although collagen is dyed the range which carried out fibrosis in immunohistochemical investigation (drawing 3), As shown in the following figure of drawing 3, by the physiological saline administration group (left figure), the part dyed by collagen was accepted widely, but by the follistatin 2microg administration group (right figure), the ranges dyed were very few and it turned out well that fibrosis is controlled. When fibrosis was carried out, an alpha-actin positive cell came to be detected, but as shown in the above figure of drawing 3, many alpha-actin positive cells were detected by the physiological saline administration group (left figure), but by a follistatin 2microg administration group (right figure), it was hardly detected. It turned out that hydroxyproline concentration is rising by administration of DMN and it is accompanied by the fibrosis of a hepatic tissue (drawing 8). This had also controlled the increase on the dosage dependence target by prescribing follistatin for the patient simultaneously, and also accepted the significant difference by the follistatin 2microg administration group. From these things, follistatin administration showed that the fibrosis by DMN could be controlled on a dosage dependence target. Although apoptosis was accepted to 18% by DMN administration, apoptosis was controlled by prescribing follistatin for the patient simultaneously, and 8% and a significant difference were also accepted by the 2microg administration group (drawing 9).

[0019]The impaired liver function and liver fibrosis by Conclusion DMN are intentionally controlled by follistatin administration, and the extent is dose-dependency.

Furthermore by control of an impaired liver function and liver fibrosis, it is surmised that it leads to decline in mortality rate.

[0020]

[Effect of the Invention]The drugs of this invention are effective as a fibrosis depressant.

[Translation done.]